



1993

## Simultaneous Determination of Five Synthetic Antioxidants in Fats and Oils

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

---

### Recommended Citation

Yang, Shyh-Shii; Lee, Mei-Ju; Lee, Shu-Chi; Su, Shu-Ju; and Chou, Shin-Shou (1993) "Simultaneous Determination of Five Synthetic Antioxidants in Fats and Oils," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 1 : Iss. 3 , Article 8.

Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3065>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.

## 油脂中五種合成抗氧化劑之系統分析

楊仕喜 李美珠 李樹其 蘇淑珠 周薰修

行政院衛生署藥物食品檢驗局

### 摘 要

利用逆相高效液相層析法(RP-HPLC),分析食用油脂中沒食子酸丙酯(PG)、第三丁基氫醌(TBHQ)、NDGA、丁基羥基甲氧苯(BHA)及二丁基羥基甲苯(BHT)五種抗氧化劑之系統檢驗方法業已經本研究建立。其主要分析步驟為檢品溶於正戊烷,取一定量注入固相抽出分離管(Adsorbex RP-18)並收集流出液。該固相抽出分離管再用溶離液(2-Propanol/Acetonitrile=1:1)每次1 ml分別沖洗三次收集溶出液;合併流出液及溶出液並以溶離液加至4 ml供作檢液。注入定量之檢液於逆相高效液相層析儀中(管柱 $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>)同時做五種合成抗氧化劑之定量分析。

取一定量之沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯標準品混合溶解後,分別添加於各種食用油脂中,經測試結果其回收率分別為92.0~98.1%,92.2~99.9%,98.8~100.7%,90.5~97.1%及91.0~97.0%。

上述五種抗氧化劑其濃度範圍在2.5~20  $\mu$ g/ml範圍內,任取五種濃度加以測試,其標準曲線及檢量線均能維持良好之線性關係。本系統檢驗法不僅操作簡便,溶媒的使用量大減,並具良好的線性關係及回收率,在對食用油脂進行上述五種抗氧化劑之同時分析時效果亦十分卓越。

### 前 言

食用油脂、含脂食品及經油炸之食品,無法久存,放置一段時間就會產生油耗味,經研究發現,最主要原因乃在於其所含不飽和脂肪酸在含氧的情況下,進行一連串的氧化反應而導致油脂劣變。

抗氧化劑早在1940年代因研究沒食子酸丙酯發現其具有顯著的抗氧化效果而受到注意<sup>(1)</sup>,抗氧化劑被使用於食品而進入商業化始於1947年<sup>(2)</sup>,丁基羥基甲氧苯(BHA)就是第一個被使用的合成抗氧化劑。其後美國又於1954年及1972年分別准許二丁基羥基甲苯(BHT)及第三丁基氫醌(TBHQ)作為抗氧化劑使用於食品<sup>(1)</sup>。目前世界各國在食品中使用最多最普遍的五種抗氧化劑為丁基羥基甲氧苯、二丁基羥基甲苯、第三丁基氫醌、沒食子酸丙酯及NDGA。我國目前規定准用於食用油脂中之抗氧化劑有丁基羥基甲氧苯、二丁基羥基甲苯、第三丁基氫醌、沒食子酸丙酯及癒創樹脂(Guaiac Resin),其使用範圍及用量標準均有明文規定<sup>(3)</sup>。

食品中所含之抗氧化劑除主要係因食品製造過程添加者外,尚有部份或可能係由於盛裝之塑膠容器或包裝材料中所含之抗氧化劑因與食品長時間的接觸而移行到食品中者<sup>(4)</sup>。

為配合食品衛生安全管理及提供食品製造業者提高產品之品質衛生起見,對於食用油脂及油炸食品中抗氧化劑分析方法之建立實屬必要;目前僅丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯建立公定檢驗方法<sup>(5)</sup>,其他抗氧化劑均尚未建立。由於抗氧化劑混合使用,其抗氧化力具有相乘之效果<sup>(2)</sup>;因此,抗氧化劑以混合製劑併用兩種或兩種以上抗氧化劑被添加之情形更加普遍,為此,對於食用油脂及油炸食品中抗氧化劑系統分析方法之建立就更加殷切。

本系統分析法所探討之抗氧化劑對象為丁基羥基甲氧苯、二丁基羥基甲苯、第三丁基氫醌、沒食子酸丙酯及NDGA五種,NDGA雖非為我國法定抗氧化劑,但在國外其經常替代癒創樹脂(Guaiac Resin)而被添加於油脂中因此將其納入探討對象之一。癒創樹脂係天然物,成份複雜無法共同納入

探討。

食品中抗氧化劑之萃取方法經查文獻,計有:蒸餾抽出去(Steam Extraction)<sup>(6-8)</sup>、液-液抽出法(Liquid-Liquid Extraction)<sup>(9)</sup>、熱溶媒抽出法(Hot Solvent Extraction)<sup>(10)</sup>、冷溶媒抽出法(Cold Solvent Extraction)<sup>(11)</sup>及柱層色層分離法(Column Chromatography)<sup>(12)</sup>等。至於其測定方法有比色法(Colorimetric Method)<sup>(14,15)</sup>、紫外線分光光度法(UV Spectrophotometric Method)<sup>(16)</sup>、濾紙及薄層層析法(Paper and Thin-Layer Chromatographic Method)<sup>(10)</sup>、氣相層析法(Gas Chromatographic Method)<sup>(17-20)</sup>及液相層析法(High-Performance Liquid Chromatographic Method)<sup>(21,22)</sup>等。然這些分離方法及測定方法不是操作手續繁雜就是無法同時測定五種目標抗氧化劑,應用上似有困難。目前A.O.A.C.1984年版公布方法以液相層析法為主<sup>(23)</sup>;雖能同時測定五種目標抗氧化劑,但其分離方法仍採用液-液抽出法,整個分離操作過程極為繁雜,檢測時不但費時,使用之溶媒亦多,仍非最理想之分離測定方法。由此,本研究計劃為達快速且同時分析之目的,仍以液相層析法為主,配合固相抽出分離管(Adsorbex Solid Phase Extraction Column; Adsorbex RP-18)及樣品製備器(Adsorbex SPU. Sample Preparation Unit)之使用,而探究出一套快速且能同時分析五種目標抗氧化劑之理想分離測定方法。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

添加回收試驗用之食用油脂:豬油、米油、沙拉油、玉米油、蔬菜油、葵花子油、紅花子油、花生油均購於超級市場;並經檢驗確實不含任何合成抗氧化劑。

### 二、器具與裝置

(一)高效液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography)

1. 溶媒梯度控制器:Waters 600E
2. 溶媒輸送系統:Waters U6K
3. UV偵測器:Waters Model 481
4. 積分儀:Waters 745

(二)減壓濃縮裝置: Buchi 461, Yamato WP-15, Firstek B204, Buchi B161

(三)振盪器: Precision Scientific Company U.S.A.

(四)分光光度計: Spectrophotometer U-3200, Hitachi

(五)刻度試管: 5 ml, 10 ml均附蓋

(六)樣品製備器(Adsorbex SPU-Sample Preparation Unit): E. Merck Cat. No. 19835

(七)固相抽出分離管(Solid Phase Extraction Column): Adsorbex RP-18 (400 mg), E. Merck Cat. No. 19840

(八)攪拌器(Multi-blender Mill): 日本精機製作所

### 三、試藥

(一)甲醇(Methanol): E. Merck, LC級

(二)乙腈(Acetonitrile)、正己烷(n-Hexane): J.T Baker, LC級

(三)異丙醇(Iso-propanol): ALPS, LC級

(四)醋酸(Acetic Acid): 日本和光純藥株式會社, 試藥特級

(五)正丙烷(n-Pentane): Fluka, 分析級

### 四、標準品

(一)沒食子酸丙酯(Gallic Acid n-Propyl Ester), 東京化成工業株式會社

(二)第三丁基氫醌(tert-Butylhydroquinone), 東京化成工業株式會社

(三)NDGA (Nordihydroguaiaretic Acid), SIGMA Chemical Company

(四)丁基羥基羥基甲氧苯(3-tert-Butyl-4-hydroxy-anisole), 東京化成工業株式會社

(五)二丁基羥基甲苯(Butylated Hydroxytoluene), 東京化成工業株式會社

### 五、試液之調製

(一)標準溶液之調製

精確稱取適量之沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA、丁基甲氧苯、二丁基羥基甲苯以異丙醇/乙腈(1:1)混合溶液溶解定量成各為1 mg/ml的標準原液並避光貯存於冰箱內。用時取出回溫後再以異丙醇/乙腈(1:1)混合液稀釋成100.0 μg/ml之混合標準溶液,臨用時調製。

(二)移動相溶液的調製

A液: 5%醋酸水溶液

B液: 乙腈:醋酸(95:5)

### 六、分析方法

(一)檢液之調製

1. 油脂: 精確稱取油脂檢體2 g(含抗氧化劑50

-400  $\mu\text{g/g}$ )於50 ml之燒杯中,加入少量正戊烷溶解(固體油脂須先微溫加熱溶解)後移入10 ml定量刻度試管中,燒杯再以少許正戊烷洗清移入,並以正戊烷定容至10 ml。取其1 ml注入樣品製備器上預先製備好之固相抽出分離管中(Adsorbex RP-18)抽氣過濾,流出液流入樣品製備器內之5 ml刻度試管中。該固相抽出分離管再用溶離液(2-Propanol/Acetonitrile=1:1)每次1 ml分別沖洗三次。溶出液流入盛有流出液之刻度試管內並以溶離液定容至4 ml供作檢液。

2. 油炸食品中之油脂:檢體以攪拌器粉碎後取適量置500 ml抽出瓶,加入適量正己烷,充分振盪5分鐘,過濾,濾液移入250 ml濃縮瓶中,於低於40°C之水浴上進行減壓濃縮至僅剩油脂為止,取油脂2 g於50 ml之燒杯中,以下步驟依照油脂檢液之調製。

### (二) 高效液相層析分析

#### 1. 高效液相層析條件

液相層析分離管 (Chromatographic Column)

Stainless Steel, 250 mm  $\times$  4.6 mm I.D.

$\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>

檢測器:UV 280 nm

流速:2 ml/min

移動相:A液:5%醋酸水溶液

B液:乙腈:醋酸(95:5)

移動相採線性梯度遞變(Linear Gradient)

#### 2. 檢量線之製作

精確分別量取濃度為100.0  $\mu\text{g/ml}$ 之混合標

準溶液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 ml各於10 ml定量刻度試管中,以正戊烷稀釋成10 ml,分別取1 ml注入固相抽出分離管中,以下步驟依處理檢體之方法操作。所得檢液各取25  $\mu\text{l}$ 分別注入高效液相層析儀,就所得面積與含量( $\mu\text{g}$ )繪製成檢量線。

#### 3. 定性分析

精確量取檢液與標準溶液各25  $\mu\text{l}$ ,分別注入高效液相層析儀,依其所得層析圖就其對應波峰加以比對,以鑑定該五種抗氧化劑之位置與滯留時間。

#### 4. 定量分析

精確量取檢液與標準溶液各25  $\mu\text{l}$ ,分別注入高效液相層析儀,就其所測得之波峰面積,依對應檢量線求出檢體中該抗氧化劑之含量。

#### 5. 計算公式

$$\text{含抗氧化劑量(ppm)} = B \times 1600/W$$

B:由檢液注入量25  $\mu\text{l}$ 之波峰面積依檢量線求得之抗氧化劑含量( $\mu\text{g}$ )

W:檢體重量(g)

## 結果與討論

### 一、高效液相層析儀之檢測

本實驗係樣品經溶媒稀釋後,直接經固相抽出分離管處理,所得檢液,取25  $\mu\text{l}$ 注入HPLC,利用逆相層析管柱藉移動相溶媒由溶媒梯度控制器配液

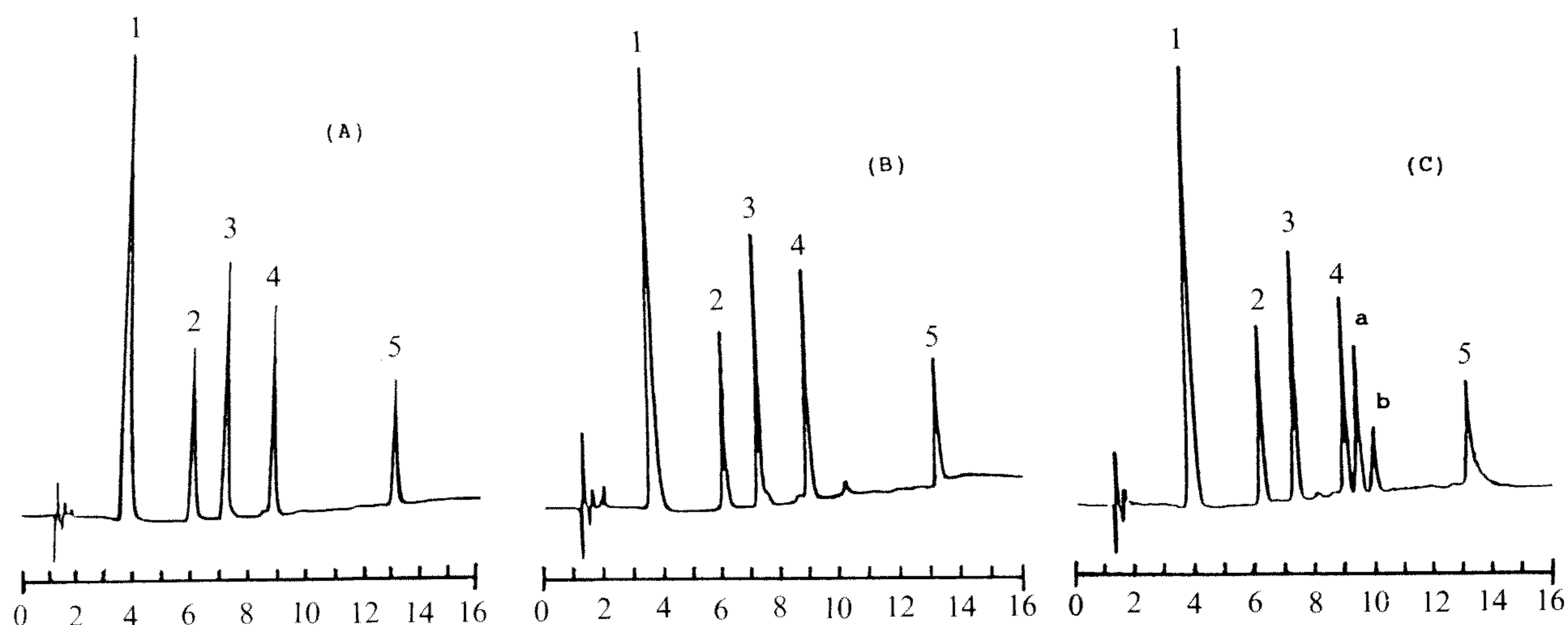
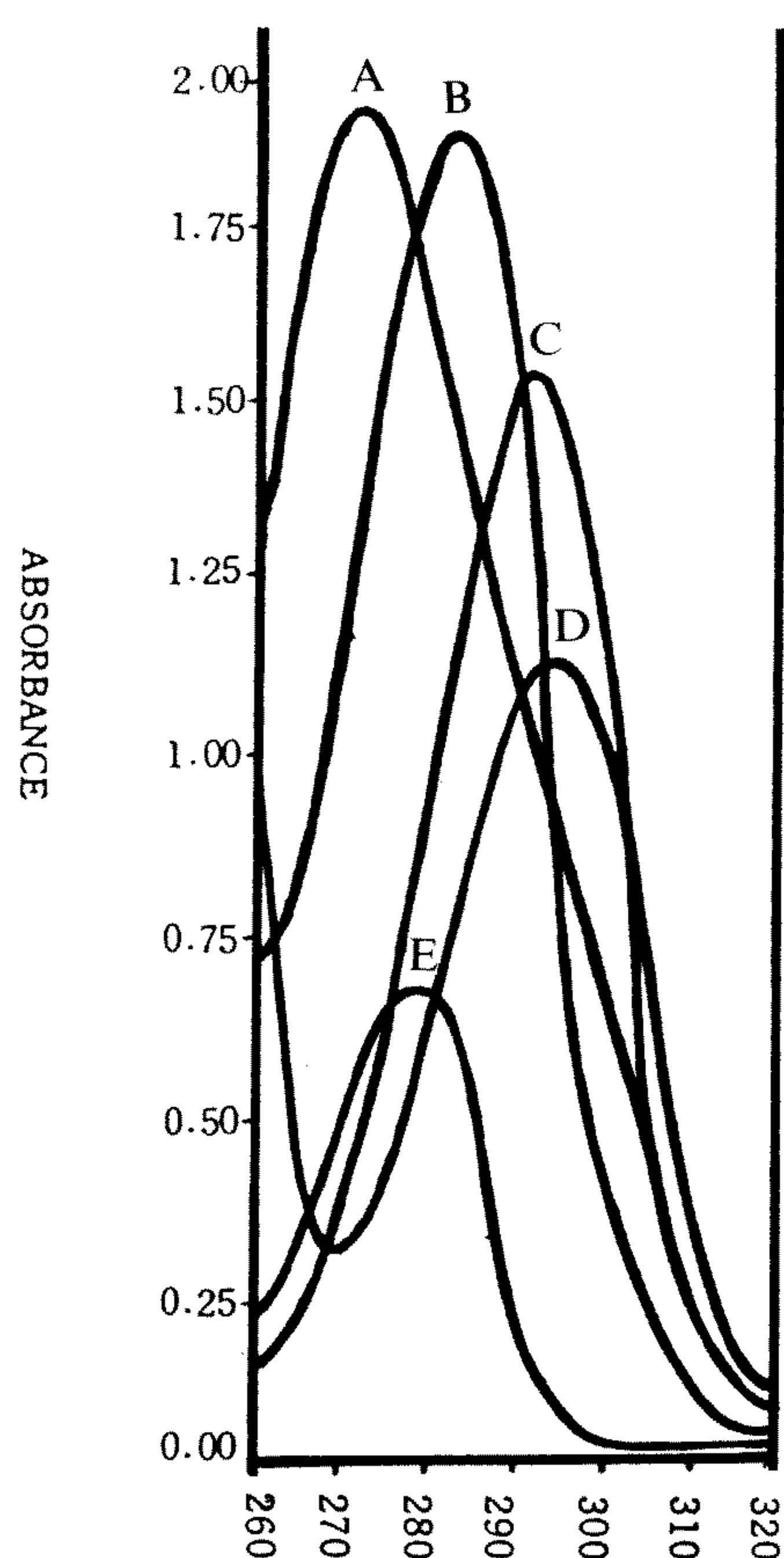


Figure 1. HPLC chromatograms of the antioxidants. (ca. 0.5  $\mu\text{g}$  each antioxidant): 1. PG; 2. TBHQ; 3. NDGA; 4. BHA; 5. BHT; a and b: unknown. (A)standard; (B)in soybean oil; (C)in lard.



**Figure 2.** Absorption spectra in the ultraviolet region of antioxidants. A. PG; B. NDGA; C. BHA; D. TBHQ; E. BHT.

在 10 分鐘內，含 5% 醋酸之去離子水之 A 液，依線性遞減方式由 70% 遞減至 0%；於此同時，含 5% 醋酸之乙腈之 B 液，依線性遞增方式，由 30% 遞增至 100%，並繼續保持 100% 持續 4 分鐘之溶離，於 280 nm 下檢測。依此條件下測得沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯五種目標抗氧化劑之滯留時間(Retention Time)分別為 3.62、5.91、7.04、8.65 及 12.83 分鐘，其典型之層析圖譜如：圖一。

## 二、測定波長之選擇

一般酚類抗氧化劑在紫外線區域均有極為良好的吸光性波長可資做為檢測波長。將沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯五種目標抗氧化劑由波長 260-320 nm 之紫外線區域進行掃描測試結果發現，該五種目標抗氧化劑之最大吸收波長分別為 273.5、295.0、284.0、291.3 及 277.4 nm (見圖二)。依據測試結

果顯示，該五種目標抗氧化劑之最大吸收波長彼此間均非常接近，對於同時檢測該五種抗氧化劑助益頗大。因此由 260 至 320 nm 之間選擇 270、280 及 290 nm 三個定點波長作為同時檢測該五種目標抗氧化劑之檢測波長；經測試比較結果，該五種目標抗氧化劑之吸收強度彼此間互有消長，然以 270 nm 作檢測波長時，對第三丁基氫醌、丁基羥基甲氧苯吸收強度欠佳；而以 290 nm 作為檢測波長時對沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA、丁基羥基甲氧苯之吸收強度均很好，唯獨對二丁基羥基甲苯吸收強度不良。若改以 280 nm 作為檢測波長時，對沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA 及丁基羥基甲氧苯彼此間之吸收強度雖稍有消長之改變，但影響不大，然卻對二丁基羥基甲苯之吸收度增強很多(見圖三、圖四)。由此結果，本法乃決定以 280 nm 作為該五種目標抗氧化劑同時進行分析時之檢測波長。

## 三、檢液之調製

(一)固相抽出分離管(Solid Phase Extraction Column)引進使用作為檢液調製之淨化器具

本實驗檢體為油脂(含植物油及動物油)；開始時，試著以正戊烷將油脂稀釋過濾後，直接上機做高效液相層析分析，結果使儀器壓力不斷升高，最後導致當機；經檢查結果發現，乃層析分離管受到雜質阻塞或造成不可逆性吸附而使該層析分離管失去功能。為此，乃引進市售之固相抽出分離管-Adsorbex RP-18 (400 mg)作檢液調製時之淨化器具，使用的結果，比起一般傳統的調製法，不但縮減淨化時間增加其使用之簡便性，而且不污染層析分離管，所分析的結果更令人滿意。

(二)「液-液抽出法」與「固相抽出法」之比較

A.O.A.C.1984 年版公佈之抗氧化劑檢驗方法，其油脂檢液之前處理仍採用液-液抽出法，淨化後做液相層析定量。本實驗引進固相抽出分離管作為油脂檢液淨化器具，淨化後直接做液相層析定量，並以上述方法作一比較，其結果如表一及表二所示。抗氧化劑添加於植物油後回收測試之結果中，除沒食子酸丙酯 200  $\mu\text{g}$ 、第三丁基氫醌 300  $\mu\text{g}$ 、NDGA 300  $\mu\text{g}$ 、丁基羥基甲氧苯 200  $\mu\text{g}$  及二丁基羥基甲苯 300  $\mu\text{g}$  之添加量，以固相抽出法處理之回收測試，其分別之標準偏差值(S.D.)和變動係數值(C.V.)比液-液抽出法處理之對應標準偏差值和變動係數值稍高外，其他添加量之回收測試結果，不是差不多就是稍優於液-液抽出法處理之測試結果。至於動物油中之測試結果幾乎均優於液-液抽出法。由以上結果比較，固相抽出法的確優於液-液抽

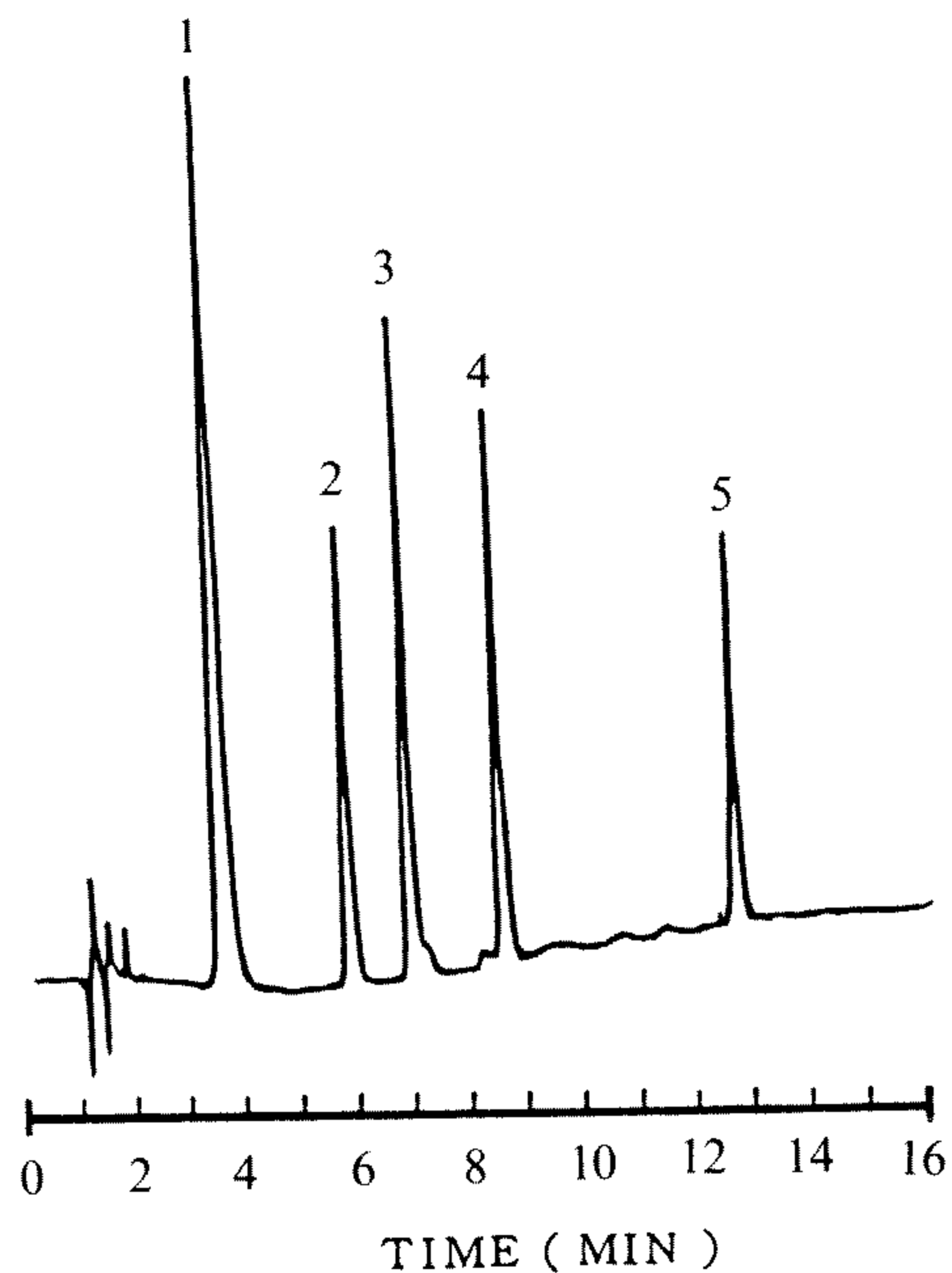


Figure 3. HPLC chromatogram of the antioxidants detected at UV 280 nm. 1. PG; 2. TBHQ; 3. NDGA; 4. BHA; 5. BHT.

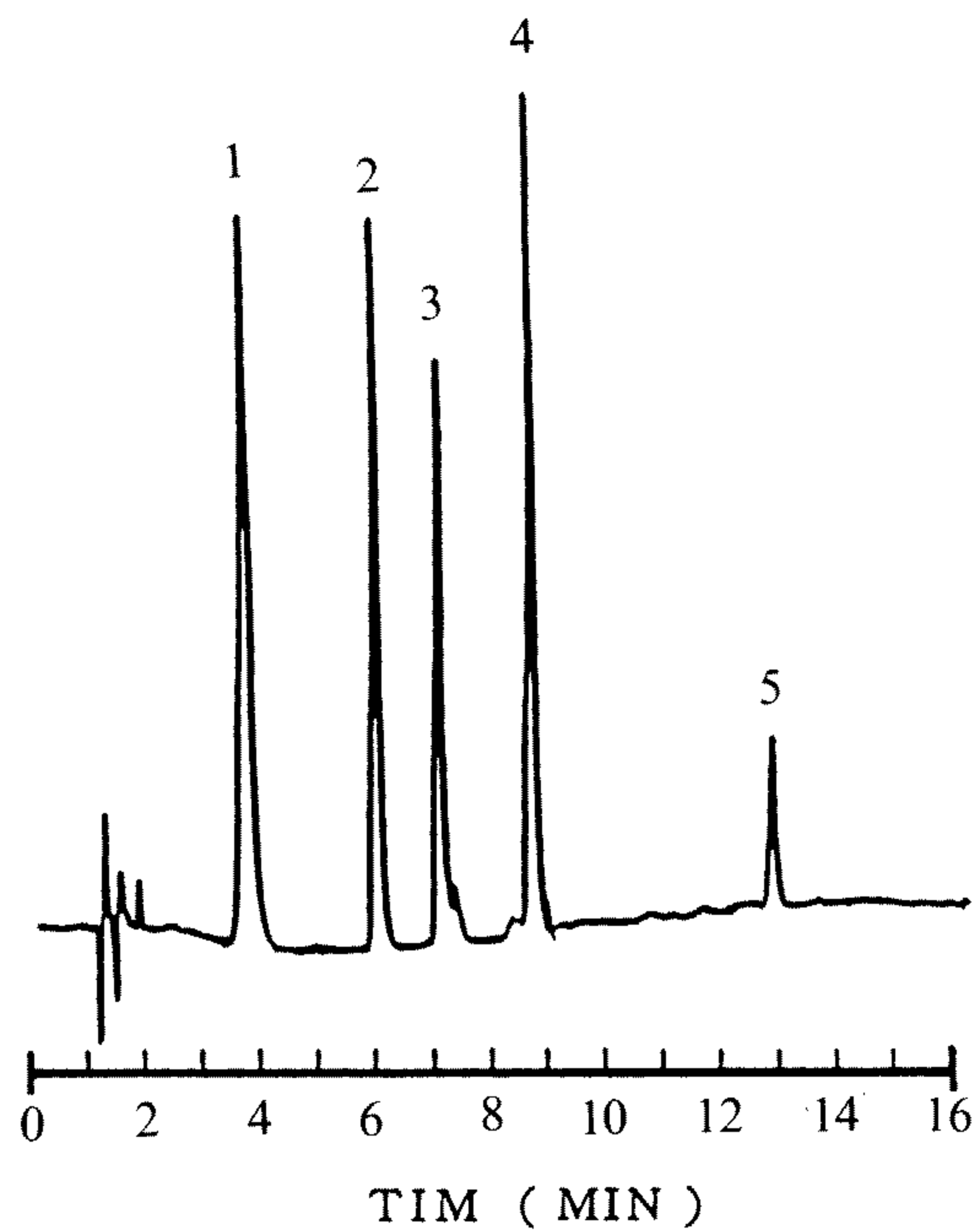


Figure 4. HPLC chromatogram of the antioxidants detected at UV 290 nm. 1. PG; 2. TBHQ; 3. NDGA; 4. BHA; 5. BHT.

出法。

#### (三)固相抽出分離管溶離液之選擇

本法探究之五種目標抗氧化劑,彼此間之極性均有差異,其極性由小至大為BHT>BHA>NDGA>TBHQ>PG,因此欲從固相分離管中溶離出該五種目標抗氧化劑,溶離液之選擇就顯得格外重要。經做各種不同溶媒溶離篩選試驗後,選定乙腈/異丙醇(1:1)混合液及甲醇,進一步做該五種目標抗氧化劑之溶離測試比較(見表三)。由該測試結果顯示,由於甲醇之極性大於乙腈/異丙醇之混合液,因此對沒食子酸丙酯之溶離效果好,但對極性較小丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯溶離效果較差。反觀乙腈與異丙醇之混合液對五種抗氧化劑之溶離效果均佳。

(四)溶離液、溶離次數、溶離液量與溶出抗氧化劑及其回收關係:

利用固相抽出分離管(Adsorbex RP-18)分離抗氧化劑,所使用溶離液之溶離次數與使用之溶離液量與溶出之抗氧化劑及其回收情形具有相當密切的關係,茲就以五支固相抽出分離管,分別注入以正戊烷稀釋10 ml之混合標準品溶液1 ml(40 μg/ml),並分別收集其流出液,其中第一支不加任何溶離液沖洗,第二支以1 ml之溶離液沖洗,第三支

每次以1 ml之溶離液沖洗兩次,第四支每次以1 ml溶離液沖洗三次,第五支以3 ml溶離液沖洗,分別收集其溶出液並與各對應之流出液合併,最後以溶離液適量各添加至總量4 ml後作高效液相層析分析,所得結果如圖五所示,由結果顯示,以每次1 ml溶離液分別沖洗三次之各抗氧化劑回收率均優於以3 ml溶離液一次沖洗之各對應抗氧化劑回收率。

#### 四、標準曲線與檢量線

沒食子酸丙酯、第三丁基氫醌、NDGA、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯五種目標抗氧化劑之混合標準溶液,分別調製成2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/ml濃度,各取25 μl注入高效液相層析儀,所得之波峰面積與其含量繪製成之標準曲線及同濃度依檢量線製作所得之檢量線,其線性關係均非常良好。

#### 五、添加回收試驗

以國人常吃之食用油脂:豬油、米油、沙拉油、玉米油、蔬菜油及葵花子油、紅花子油及花生油為對象,各稱取2 g油脂,並各添加五種目標抗氧化劑各300 μg,以下步驟依照本實驗方法操作進行回收試驗,其結果如表四所示,沒食子酸丙酯、第三丁基

**Table I.** Comparison of recovery of antioxidants in soybean oil determined by liquid-liquid extraction and Adsorbex extraction.

| N=3  | Adsorbex Extraction        |                            |           |            | Liquid/Liquid Extraction   |                            |             |             |
|------|----------------------------|----------------------------|-----------|------------|----------------------------|----------------------------|-------------|-------------|
|      | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | S.D.<br>* | C.V.<br>** | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | S.D.<br>*** | C.V.<br>*** |
| PG   | 50                         | 46.81                      | 2.035     | 4.35       | 50                         | 45.53                      | 0.907       | 1.99        |
|      | 100                        | 94.89                      | 2.887     | 0.21       | 100                        | 96.77                      | 8.620       | 8.91        |
|      | 200                        | 187.9                      | 6.515     | 3.47       | 200                        | 193.9                      | 0.409       | 0.21        |
| TBHQ | 100                        | 96.83                      | 2.181     | 2.25       | 100                        | 94.73                      | 3.534       | 3.73        |
|      | 200                        | 195.8                      | 0.276     | 0.14       | 200                        | 187.1                      | 1.075       | 0.57        |
|      | 300                        | 276.7                      | 10.29     | 3.72       | 300                        | 281.3                      | 4.194       | 1.49        |
| NDGA | 100                        | 97.03                      | 2.171     | 2.24       | 100                        | 104.2                      | 0.182       | 0.18        |
|      | 200                        | 192.5                      | 8.744     | 4.54       | 200                        | 194.0                      | 3.653       | 1.88        |
|      | 300                        | 295.6                      | 8.833     | 2.99       | 300                        | 295.9                      | 1.655       | 0.56        |
| BHA  | 100                        | 96.64                      | 1.004     | 1.04       | 100                        | 98.17                      | 3.673       | 3.74        |
|      | 200                        | 183.5                      | 7.064     | 3.85       | 200                        | 191.4                      | 3.952       | 2.06        |
|      | 300                        | 297.8                      | 2.459     | 0.83       | 300                        | 299.1                      | 5.741       | 1.92        |
| BHT  | 100                        | 92.61                      | 0.382     | 0.42       | 100                        | 97.54                      | 4.421       | 4.53        |
|      | 200                        | 197.2                      | 4.804     | 2.44       | 200                        | 175.2                      | 4.543       | 2.59        |
|      | 300                        | 290.1                      | 8.738     | 3.01       | 300                        | 266.6                      | 4.877       | 1.83        |

註: \* Found( $\mu\text{g}$ ):表回收量。

\*\* S.D.:表標準偏差。

\*\*\* CV.(%):表變異係數。

氫醌、NDGA、丁基羥基甲氧苯及二丁基羥基甲苯之回收率分別為92.0~98.1, 92.2~99.9, 98.7~100.7, 90.5~97.1及91.1~97.0%。

更爲了進一步印證所建立之系統分析之適用性及可靠性,乃擇一件標示含 TBHQ 200 ppm 以下之市售食用油品檢體,分別以A.O.A.C.1984年公告之液相層析法及本系統分析法(固相抽出分離法)進行三重複檢測,並就上述兩種方法檢測一件樣品分別所消耗之溶媒及所需時間連同三重複檢測結果加以比較,由比較結果顯示,本系統分析法與A.O.A.C.法其分析結果彼此間雖無顯著差異,但是本系統分析法所須消耗溶媒量每件僅13 ml 而A.O.A.C.法則須256 ml,本系統分析法所消耗溶媒量遠比A.O.A.C.法節省許多;就分析時間而言,本系統分析法每件35分鐘而A.O.A.C.法則須費時145分鐘,本系統分析法之分析時間顯著地縮

短;由上述之比較結果可見本實驗所建立之油脂中抗氧化劑系統分析法之優越性。

## 結 論

本實驗所建立之油脂中五種抗氧化劑之系統分析法,與A.O.A.C.所公佈之液相層析法比較,最大不同處,乃在於檢液之調製,A.O.A.C.之液相層析法檢液調製仍採用液-液抽出法,須消耗較大量溶媒,操作繁雜且消耗時間長,容易形成乳化現象爲其缺點,然本實驗所建立系統分析法,檢液之調製,使用固相抽出分離管作爲淨化器具,操作簡便迅速可節省大量溶媒之消耗,檢測之準確性亦高。由此觀之本實驗所建立之「油脂中五種抗氧化劑系統分析法」無論在經濟效益,操作所需時間及檢測結果均相當令人滿意。

**Table 2.** Comparison of recovery of antioxidants in lard determined by liquid-liquid extraction and Adsorbex extraction.

| Antioxidant | Adsorbex Extraction        |   |                    |                            | Liquid/Liquid Extraction   |   |                    |                            |
|-------------|----------------------------|---|--------------------|----------------------------|----------------------------|---|--------------------|----------------------------|
|             | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Found <sup>*</sup><br>( $\mu\text{g}$ ) | S.D. <sup>**</sup> | C.V. <sup>***</sup><br>(%) | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Found <sup>*</sup><br>( $\mu\text{g}$ ) | S.D. <sup>**</sup> | C.V. <sup>***</sup><br>(%) |
| PG          | 50                         | 46.53                                   | 1.483              | 3.19                       | 50                         | 46.80                                   | 3.340              | 7.15                       |
|             | 100                        | 93.32                                   | 4.308              | 4.62                       | 100                        | 96.64                                   | 2.800              | 2.90                       |
|             | 200                        | 190.9                                   | 0.727              | 0.38                       | 200                        | 190.8                                   | 4.340              | 2.27                       |
| TBHQ        | 100                        | 94.83                                   | 2.744              | 2.89                       | 100                        | 87.84                                   | 6.900              | 7.86                       |
|             | 200                        | 194.6                                   | 3.165              | 1.63                       | 200                        | 192.3                                   | 9.440              | 4.91                       |
|             | 300                        | 292.4                                   | 5.789              | 1.98                       | 300                        | 289.2                                   | 17.91              | 6.19                       |
| NDGA        | 100                        | 96.98                                   | 1.844              | 1.90                       | 100                        | 94.43                                   | 6.030              | 6.39                       |
|             | 200                        | 202.1                                   | 2.578              | 1.28                       | 200                        | 194.5                                   | 8.250              | 4.24                       |
|             | 300                        | 300.8                                   | 0.935              | 0.31                       | 300                        | 287.2                                   | 18.24              | 6.35                       |
| BHA         | 100                        | 94.59                                   | 3.033              | 3.21                       | 100                        | 96.47                                   | 4.150              | 4.31                       |
|             | 200                        | 185.7                                   | 1.162              | 0.63                       | 200                        | 196.8                                   | 12.22              | 6.21                       |
|             | 300                        | 286.7                                   | 10.08              | 3.52                       | 300                        | 284.1                                   | 14.22              | 5.01                       |
| BHT         | 100                        | 97.76                                   | 3.684              | 3.77                       | 100                        | 90.18                                   | 2.040              | 2.26                       |
|             | 200                        | 195.7                                   | 0.683              | 0.35                       | 200                        | 172.6                                   | 1.660              | 0.96                       |
|             | 300                        | 291.1                                   | 5.219              | 1.79                       | 300                        | 261.9                                   | 17.84              | 6.81                       |

註: \* Found( $\mu\text{g}$ ):表回收量。

\*\* S.D.:表標準偏差。

\*\*\* CV.(%):表變異係數。

**Table 3.** Effect of elution solvent on the recovery of antioxidants in the Adsorbex extraction column.

| N=3  | Acetonitrile + Isopropanol(1:1) |                    |                         | Methanol                  |                    |                         |
|------|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------|
|      | Recovery( <sup>*</sup> %)       | S.D. <sup>**</sup> | C.V. <sup>***</sup> (%) | Recovery( <sup>*</sup> %) | S.D. <sup>**</sup> | C.V. <sup>***</sup> (%) |
| PG   | 95.91                           | 4.05               | 4.22                    | 98.83                     | 0.57               | 0.50                    |
| TBHQ | 96.11                           | 1.88               | 1.96                    | 83.39                     | 7.53               | 9.03                    |
| NDGA | 99.61                           | 1.50               | 1.51                    | 98.06                     | 1.47               | 1.50                    |
| BHA  | 94.27                           | 3.31               | 3.52                    | 86.11                     | 4.06               | 4.72                    |
| BHT  | 98.63                           | 0.63               | 0.63                    | 91.94                     | 3.17               | 3.44                    |

註: \* Recovery(%):表回收率。

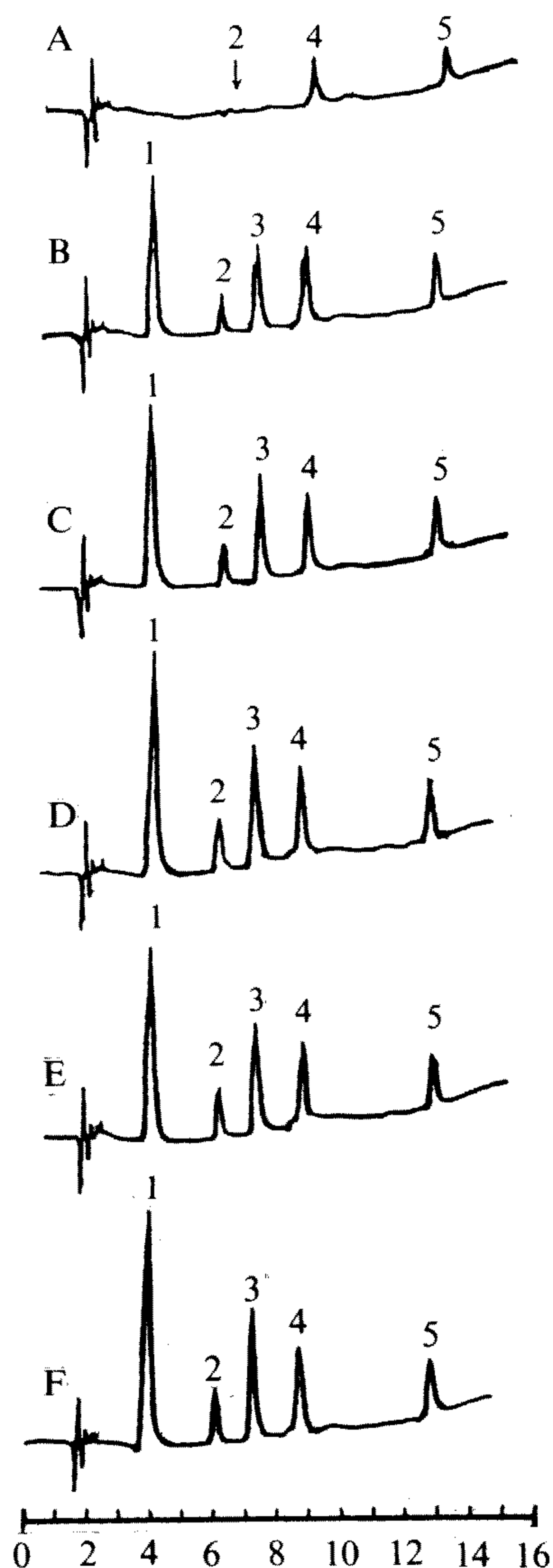
\*\* S.D.:表標準偏差。

\*\*\* CV.(%):表變異係數。



**Table 4.** Recoveries of the synthetic antioxidants added to edible oil.

| 油 脂     | PG                         |                            | TBHQ            |                            | NDGA            |                            | BHA             |                            | BHT             |                            |                 |
|---------|----------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
|         | Added<br>( $\mu\text{g}$ ) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) | Found<br>( $\mu\text{g}$ ) | Recovery<br>(%) |
| 豬 油     | 300                        | 294.4                      | 98.1            | 292.4                      | 97.5            | 300.8                      | 100.3           | 286.8                      | 95.6            | 291.1                      | 97.0            |
| 米 油     | 300                        | 290.4                      | 96.8            | 291.3                      | 97.1            | 296.8                      | 98.9            | 275.4                      | 91.8            | 273.2                      | 91.1            |
| 沙 拉 油   | 300                        | 292.4                      | 97.6            | 276.7                      | 92.2            | 301.9                      | 100.7           | 291.2                      | 97.1            | 290.2                      | 96.7            |
| 玉 米 油   | 300                        | 293.2                      | 97.7            | 295.1                      | 98.4            | 299.7                      | 99.9            | 290.8                      | 96.9            | 294.6                      | 95.1            |
| 蔬 菜 油   | 300                        | 275.9                      | 92.0            | 293.5                      | 97.8            | 296.7                      | 98.9            | 271.5                      | 90.5            | 280.5                      | 93.5            |
| 葵 花 子 油 | 300                        | 283.2                      | 94.4            | 299.8                      | 99.9            | 296.5                      | 98.8            | 290.9                      | 97.0            | 279.3                      | 93.1            |
| 紅 花 子 油 | 300                        | 293.9                      | 98.0            | 283.0                      | 94.3            | 297.5                      | 99.2            | 289.8                      | 96.6            | 286.5                      | 95.5            |
| 花 生 油   | 300                        | 285.0                      | 95.0            | 281.3                      | 93.8            | 295.9                      | 98.7            | 282.9                      | 94.3            | 284.7                      | 94.9            |



**Figure 5.** HPLC chromatograms of the antioxidants  
1. PG; 2. TBHQ; 3. NDGA; 4. BHA; 5. BHT.

A. Separated by Adsorbex RP-18 column without eluting with acetonitrile/2-propanol.

B. Separated by Adsorbex RP-18 column eluting with 1 ml of acetonitrile/2-propanol.

C. Separated by Adsorbex RP-18 column eluting duplicated with 1 ml of acetonitrile/2-propanol.

D. Separated by Adsorbex RP-18 column eluting thrice with 1 ml of acetonitrile/2-propanol.

E. Separated by Adsorbex RP-18 column eluting with 3 ml of acetonitrile/2-propanol.

F. Antioxidants without passing through Adsorbex RP-18 column.

### 參考文獻

1. Robards, K. and Dilli, S. 1987. Analytical Chemistry of Synthetic Food Antioxidants-A Review. *Analyst*. 112 : 933-943.
2. Thomas, E. F. 1977. "Handbook of Food Additives". 2nd. Edition. CRC Press, New York.
3. 行政院衛生署."食品添加物使用及用量標準". 77.8.出版.
4. Crompyon, T. R. 1979. "Additive Migration From Plastics Into Food". Pergamon Press. London.
5. 行政院衛生署."食品中抗氧化劑之檢驗方法". 行政院衛生署.77.1.13.衛署食字第707604號公告.
6. Anglin, C., Mahon, J. H. and Chapman, R. A. 1956. Determination of Antioxidants in Edible Fats. *J. Agr. Fd. Chem.* 4 : 1018-1023.
7. Filipic, V.J. and Ogg, C.L. 1960. Determination of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene in Potato Flakes. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 43 : 795-799.
8. Sloman, K. G., Romagnoli, R. J. and Cavaignol, J. C. 1962. Trace Analysis of BHA and BHT in Food Products. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 45 : 76-80.
9. Sahasrabudhe, M. R. 1964. Food Additives, Application of Thin Layer Chromatography to the Quantitative Estimation of Antioxidants: BHA. BHT. PG. and NDGA. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 47(5) : 888-893.
10. Austin, J. J. 1954. Analysis of Butylated Hydroxyanisole in Paper and Paperboard. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 31 : 424-427.
11. Anderson, R. H. and Nelson, J. P. 1963. A Method for the Determination of BHA and BHT in Cereal Products. *Food Tech.* 17(7) : 95-96.
12. Caldwell, E. F., Nehring, E. W., Postweiler, J. E., Smith, Jr., G. M., and Wilbur, C. J. 1964. Package Treatment Versus Direct Application as a Means of Incorporating BHT in Shredded Breakfast Cereals. *Food Tech.* 18(3) : 125-128.
13. Mahon, J.H. and Chapman, R.A. 1951. Butylated Hydroxyanisole in Lard and Shortening. *Anal. Chem.* 23(8) : 1120-1123.
14. Mahon, J.H. and Chapman, R.A. 1951. Estimation of Antioxidants in Lard and Shortening. *Anal. Chem.* 23(8) : 1116-1120.
15. Whetsel, K.B., Krell, M., Johnson, F.E. 1957. Infrared Analysis of Commercial Butylated Hydroxyanisole. *J. Agr. Fd. Chem.* 5(8) : 602-604.
16. Schwecke, W. M. and Nelson, J. H. 1964. Determination of Antioxidants in Certain Food Products and Packing Materials by Gas Chromatography. *J. Agr. Fd. Chem.* 12 : 86-89.
17. 中里光南等.1980.食用油脂の酸化防止劑の系統分析法.食衛誌.22(3) : 239-245.
18. 日本藥學.1980.日本衛生試驗法註解.PP.345-350.
19. 中里光南等.1979.食用油脂中の tert-Butylhydroquinone, BHA. および BHTの同時分析法.食衛誌.21(1) : 64-69.
20. Hashizume, K., Toda, C., Yasui, T. and Naganano, H. 1988. Determination of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene in Oily Foods and Dried Fish by High Performance Liquid Chromatography. *Eisei Kagaku(衛生化學)*.34(6) : 550-554.
21. Page, B.D. 1983. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Seven Antioxidants in Oil and Lard. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(3) : 727-745.
22. A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis, 14th edition, Antioxidants in Food. pp. 372-375.

## Simultaneous Determination of Five Synthetic Antioxidants in Fats and Oils

SHYH-SHII YANG, MEI-JU LEE, SHU-CHI LEE,  
SHU-JU SU AND SHIN-SHOU CHOU

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan*

### ABSTRACT

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of gallic acid n-propyl ester (PG), tert-butyl hydroquinone (TBHQ), nor-dihydroguaiaretic acid (NDGA), 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in fats and oils was developed. The samples were dissolved in n-pentane. Aliquot (1 ml) of the pentane solutions was pipetted onto Adsorbex RP-18 extraction column (400 mg). The antioxidants were eluted with three 1-ml portions of acetonitrile/2-propanol (1:1). The filtrate and the eluate

were collected and mixed. The final volume was adjusted to 4 ml with acetonitrile/2-propanol and determined by HPLC with a UV detector set at 280 nm. The recoveries of PG, TBHQ, NDGA, BHA and BHT fortified to various edible fats and oils were in the range of 92.0~98.1%, 92.2~99.9%, 98.8~100.7%, 90.5~97.1% and 91.0~97.0%, respectively. Each of the standard and calibration curves for PG, TBHQ, NDGA, BHA and BHT showed a good linear relationship in the range of 2.5~20 ppm.

**Key words :** Gallic Acid n-Propyl Ester; PG, tert-butylhydroquinone; TBHQ, Nordihydroguaiaretic Acid ; BHT, 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole; BHA.